

2013 年度 修士論文要旨

海洋性珪藻 *Phaeodactylum tricornutum* における

有性生殖の定量的解析

関西学院大学大学院理工学研究科

生命科学専攻松田研究室 大井 皓正

【研究目的】通常珪藻類は無性分裂を行っており、上下の被殻の内側に新しい被殻が作られる。既存の被殻の大きさが変化しないため、半分の娘細胞は常に親細胞より小さくなる。そこで、縮小した珪藻類の多くは減数分裂を行い、増大胞子という接合子による有性生殖で大きさを回復する。また、様々な藻類で環境ストレスによる有性生殖触発も知られている。しかし、海洋性羽状目珪藻のモデル *Phaeodactylum tricornutum* の有性生殖は確認されていない。先行研究において、*P. tricornutum* のピリミジン塩基生合成経路の UMP 合成最終 2 反応を触媒する酵素 uridine monophosphate synthase 遺伝子 (*ptumps*) は、アレル間で 16 か所の一塩基多型 (SNPs) を持ち、5 か所のアミノ酸置換が予測されるヘテロ接合体だと確認された。また卒業研究で、相同染色体上の一方のアレルにコードされた UMPS が機能欠損していることが示された。*ptumps* 遺伝子は単コピーであり、野生型が有性生殖した場合、劣性 *ptumps* のホモ接合体細胞が現れると期待される。この細胞はウラシル要求性及び、オロト酸のアナログ 5-fluoro orotic acid (5-FOA) に耐性を示す (requiring uracil and resistant to 5-FOA: RURF 表現型)。この選抜系をマーカーとし、鉄飢餓環境と低塩環境、高 CO₂ 環境で顕著にコロニーが確認できた。また、それらのゲノム UMPS 配列は予想通り劣性ホモ接合体となり、例外なく SNPs が消失していた。そこで今回、この選抜実験系を利用して有性生殖因子の探索を行うことを目的とした。

【実験方法】様々な処理での有性生殖特異的因子 mRNA 蓄積量の経時的比較：他種の生物で減数分裂、有性生殖特異的だと考えられる因子について、expressed sequence tag (EST) database で珪藻でのホモログ配列の発現有無、低塩や鉄飢餓環境での発現プロファイルを確認し選択根拠とした。その後、それら因子の mRNA 蓄積量を精査するために、5% CO₂ 環境、低塩 (180 mM) 環境、窒素飢餓環境、鉄飢餓環境で処理した珪藻を処理 3 時間ごとに 9 時間まで回収し、全 RNA を抽出した後に定量的 RT-PCR を用いて比較を行った。RNA 干渉 (RNAi) による有性生殖特異的因子ホモログノックダウンでの RUF 表現型コロニー出現率変化：有性生殖特異的だと考えられる因子について、それらの mRNA を約 400 bp ごとにターゲットとした RNAi コンストラクトを製作し、珪藻に導入した。導入を確認後、それら因子の mRNA 蓄積量を調べるため、通常海水及び低塩 (180 mM) 環境で 0 時間及び 9 時間処理した珪藻の全 RNA を抽出し、半定量的 RT-PCR 及び定量的 RT-PCR を用いて比較を行った。RNAi が確認できた株に対して、鉄飢餓と低塩、高 CO₂ 処理による RUF 表現系出現を観察した。*ptumps* と別の染色体上における SNPs の確認：6 番染色体上にある *ptumps* と異なり、1 番染色体上に有り、先行研究で SNPs が確認された *PtLCIB3* において、野生型および RUF 表現型株におけるゲノム配列を比較した。

【実験結果と考察】様々な処理での有性生殖特異的因子 mRNA 蓄積量の経時的比較：有性生殖特異的因子候補ホモログ 6 つ (*BiP*、*BicD*、*Dmc1*、*Mei2*、*Rec8*、*Spo11* ホモログ) において、それぞれの因子の転写活性化のピークが各因子の予測された機能と矛盾していないことが示された。また、各因子の転写活性化は RUF 表現系出現率が高い処理でのみ有意に観察された。RNAi による有性生殖特異的因子ホモログノックダウンでの RUF 表現型コロニー出現率変化：*BiP*、*BicD*、*Dmc1*、*Mei2*、*Rec8*、*Spo11* ホモログの RNAi コンストラクトを珪藻に導入した。その結果、*Dmc1* ホモログの 3' 末端側約 400 bp を標的とした RNAi 株 (*Dmc1-i*) で、低塩 (180 mM) 9 時間培養時に RNA 蓄積量が顕著に減少していた。また、*Dmc1-i* 株を様々な環境で触発しても、RUF 表現型コロニー出現率はほとんど上昇しなかった。*ptumps* と別の染色体上における SNPs の確認：RUF 表現型株では別の染色体上の *PtLCIB3* でも SNPs が消失していたことから、体細胞分裂時の交差などによる局所的な染色体間の組換えではなく、有性生殖による大規模なアレルの組換えが起こっていることが示された。